

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 642 086
à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction

②1 N° d'enregistrement national : 89 00973

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 15/12, 15/70, 15/79; A 61 K 37/02.

①2 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 26 janvier 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOP « Brevets » n° 30 du 27 juillet 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : SANOFI, Société anonyme. — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Daniel Caput ; Pascual Ferrara ; Mourad
Kaghad.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Gène recombinant codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes et ledit facteur.

⑤7 L'invention concerne un gène recombinant comportant
une séquence d'ADN codant pour un facteur basique de
croissance des fibroblastes.

Ce gène code pour une protéine dont la séquence com-
prend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGlu
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides
aminés du code génétique.

en amont de cette sous-séquence une deuxième sous-sé-
quence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée

dans sa partie amont et comportant plus de deux acides
aminés de la suite :

LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement
une méthionine.

FR 2 642 086 - A1

D

Gène recombinant codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes et ledit facteur.

05 La présente invention concerne un nouveau gène recombinant comportant une séquence d'ADN codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes, un vecteur d'expression portant ce gène, des cellules eucaryotes et des microorganismes procaryotes contenant ce vecteur, un nouveau facteur basique de croissance des fibroblastes d'origine humaine obtenu à l'aide de ce gène ainsi qu'un nouveau médicament contenant ce facteur.

10 Le facteur basique de croissance des fibroblastes (ci-après parfois abrégé (bFGF)) est un puissant mitogène qui stimule la croissance de nombreux types de cellules dérivées du mésoderme et du neuroectoderme, en particulier celle des cellules endothéliales provenant soit de vaisseaux importants soit de capil-
15 laires. (D. Gospodarovicz et al. (1986), 46, 187-204). Son activité angiogénique en fait une protéine intéressante en tant que principe actif de médicaments, en particulier ceux destinés à stimuler la régénération des tissus endommagés à la suite de blessures ou de brûlures. (J.M. DAVIDSON et al., J.C.B. (1985), 100, 1219-1227). Ce
20 facteur présente probablement également un intérêt dans le traitement de l'infarctus du myocarde (Cf. les brevets américains 4 296 100 et 4 378 347) et dans celui des désordres neurologiques dégénératifs tels que la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (P. WALICKE et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 83,
25 3012-3016).

Pour ces applications, il paraît souhaitable de disposer d'une quantité importante de facteur basique de croissance des fibroblastes d'origine humaine (ci-après parfois abrégé hbFGF).

30 Celui-ci est présent dans de nombreuses sortes de cellules humaines, notamment celles d'organes tels que le cerveau, l'hypophyse, l'hypothalamus, les reins, les glandes surrénales, le thymus, la prostate, de phagocytes tels que les macrophages, de tissus tels que le placenta et le cartilage et de tissus malins tels les chondrosarcomes, les mélanomes et les hépatomes. Ce
35 facteur est - semble-t-il d'après les caractérisations effectuées après isolement de ce dernier à partir de diverses sources - une

protéine existant sous plusieurs formes d'activité biologique semblable, qui présentent la même séquence du côté carboxyterminal mais différent par leur nombre total d'acides aminés. Des formes de 146, 154 et 157 acides aminés ont ainsi été isolées à partir respectivement du cerveau, de la prostate et du placenta. (D. Gospodarowicz et al. (1986) Mol. Cell. Endocrinal 46, 187-204 et D. MOSCATELLI (1988) Biochimie, 70, 83-87).

Devant les quantités insuffisantes de facteur basique de croissance des fibroblastes isolées à partir de cellules humaines et les risques de contamination, notamment par les virus du sida ou de l'hépatite, il existe un besoin pour des outils et des techniques de génie génétique permettant de s'affranchir de ces inconvénients. Certains de ceux-là sont déjà connus : des plasmides recombinants codant pour les formes de 146 et 154 acides aminés ont ainsi déjà été exprimés dans *Escherichia coli* et dans d'autres cellules animales (Cf., en particulier, les demandes de brevet EP-A0237966 et WO-87 01728).

La demanderesse a construit une bibliothèque d'ADNc à partir des ARN messagers de la lignée cellulaire d'hépatome SK-HEP1, de laquelle elle a isolé, à l'aide de sondes nucléotidiques construites sur la base des séquences du hbFGF déjà connues, puis séquencé un ADNc codant pour le hbFGF. Par mutagenèse et utilisation de plasmides recombinants, elle a mis en évidence in vitro et in vivo l'existence de hbFGF comportant plus de 157 acides aminés. Cette mise en évidence n'aurait pas été réalisable sur la base des deux autres séquences non strictement identiques déjà publiées de l'ADNc du hbFGF (J. ABRAHAM et al. (1986) EMBO J., 5, 2523-2528 et T. KUROKAWA et al. (1987) Febs, 213, 1., 189-194). Cette mise en évidence a permis de construire un nouveau gène recombinant codant pour un nouveau facteur basique de croissance des fibroblastes d'origine humaine hbFGF de séquence plus longue dans sa partie amino terminale que celles des hbFGF déjà connues et présentant une activité biologique intéressante.

L'invention concerne donc un gène recombinant comportant une séquences d'ADN codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes, caractérisé en ce que celle-ci code pour une

protéine dont la séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

05 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
 10 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,

15 en amont de cette sous-séquence, une deuxième sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

20 LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement une méthionine.

25 De préférence X est un acide aminé connu pour ne pas modifier radicalement la fonction d'une protéine lorsqu'il est substitué à la méthionine. De tels acides aminés sont en particulier la méthionine, la valine, la leucine et l'isoleucine.

A cause de la dégénérescence du code génétique, il existe
 30 un grand nombre de séquences d'ADN codant pour des protéines dont les séquences répondent aux formules données ci-dessus. Pour diminuer le travail de construction du gène, on choisira de préférence une séquence d'ADN ne différant de celle du gène sauvage que par quelques nucléotides. Une telle séquence, particulièrement
 35 appréciée pour une expression du gène dans les cellules eucaryotes, est celle qui comprend une première sous-séquence :

$W_1 W_2 W_3$ GCAGCCGGGAGC
 ATCACCACGCTGCCCCGCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCCGGCCAC
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTCCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCC
 GACGGCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACCTCAA
 05 GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG
 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCCTTTTTTGAA
 CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAAGTTGGTATGTG
 GCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT
 ATACTTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA --

10

dans laquelle W_1, W_2, W_3 représentent un codon susceptible d'être
 traduit en méthionine, valine, leucine ou isoleucine, une deuxième
 sous-séquence,

en amont de la première, constituée de l'ensemble ou d'une partie
 15 tronquée dans sa partie amont d'un nombre entier de codons et
 comportant plus de deux codons de la suite :

CTGGGGGACCGGGGCGGGCCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 20 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAGGGACC

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement un codon ATG.

Une séquence de ce type particulièrement appréciée est
 celle dans laquelle la deuxième sous-séquence est l'une des
 25 sous-séquences ci-après :

GGGGACCGCGGGGCGGGCCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAGGGACC

30

et

GGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 35 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAGGGACC

Pour une expression du gène dans les microorganismes procaryotes, il est souhaitable de modifier par rapport au gène sauvage certains codons environnant le codon d'initiation ATG. Une séquence appréciée pour une expression dans *Escherichia coli* est par exemple la suivante :

```

05      ATGGGTGACCGTGGTCGTGGTCGCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
      GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
      GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAGGGACCATGGCAGCCGGGAGC
10      ATCACCACGCTGCCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCGGCCAC
      TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCC
      GACGGCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAATTCAA
      GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCCTTACCTGGCTATG
      AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCCTTTTGTAA
15      CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTG
      GCACTGAAACGAAGTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT
      ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

```

L'invention concerne également un vecteur d'expression qui porte, avec les moyens nécessaires à son expression, le gène recombinant défini précédemment.

Pour une expression dans les microorganismes procaryotes, en particulier dans *Escherichia coli*, la séquence codante doit être insérée dans un vecteur d'expression comportant notamment un promoteur efficace, suivi d'un site de fixation des ribosomes en amont du gène à exprimer, ainsi qu'une séquence d'arrêt de transcription efficace en aval du gène à exprimer. Ce plasmide doit également comporter une origine de répllication et un marqueur de sélection. Toutes ces séquences doivent être choisies en fonction de la cellule hôte.

Pour une expression dans les cellules eucaryotes, notamment dans les cellules d'ovaires de hamster chinois CHO, la séquence codante est insérée dans un plasmide (par exemple dérivé du pBR 322) comportant notamment deux unités d'expression. Une première unité dans laquelle est inséré le gène d'intérêt devant un promoteur efficace (par exemple le promoteur précoce de SV40). La

séquence autour de l'ATG d'initiation est de préférence choisie en fonction de la séquence consensus décrite par KOZAK (M. KOZAK (1978) Cell., 15, 1109-1123). Une séquence intronique, par exemple l'intron de l' α -globine de souris, peut être insérée en amont du gène d'intérêt ainsi qu'une séquence comportant un site de polyadénylation, par exemple une séquence de polyadénylation du SV40, en aval du gène d'intérêt. La deuxième unité d'expression comporte un marqueur de sélection (par exemple une séquence d'ADN) codant pour la dihydrofolate réductase (enzyme ci-après abrégée DHFR). Le plasmide est transfecté dans des cellules eucaryotes, par exemple les cellules CHO DHFR⁻ (incapables d'exprimer la DHFR). Une lignée est sélectionnée pour sa résistance au méthotrexate et exprime à un niveau suffisant le gène d'intérêt.

L'invention concerne aussi un nouveau facteur basique de croissance des fibroblastes caractérisé en ce que sa séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,
 en amont de celle-ci une deuxième sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette sous-séquence éventuellement une méthionine.

De préférence ce facteur a une séquence constituée de l'une ou l'autre des séquences ci-après :

05 GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
10 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
15 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

et

GlyGlyArgGlyArg
20 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
25 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

30

précédée éventuellement d'une méthionine.

L'invention a également trait au médicament contenant le facteur basique de croissance des fibroblastes défini ci-dessus.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples
35 ci-après :

EXEMPLE 1 : Caractérisation de formes de haut poids moléculaire du hbFGF

1) Isolation de l'ADNc

05 Une banque d'ADNc a été produite dans Escherichia coli MC 1061 par insertion de l'ADNc synthétisé à partir de l'ARNm extrait des cellules SK-HEP1 dans le vecteur pUC 9 (Pharmacia). La préparation de l'ARN a été effectuée comme l'a décrit Cathala et al. (1). La construction des molécules d'ADN recombinant a été réalisée suivant la technique de l'"amorce-adaptateur" (2). Cette

10 stratégie de clonage utilise deux oligonucléotides synthétiques partiellement complémentaires. Le premier appelé "amorce" permet la synthèse de l'ADNc. Le deuxième oligonucléotide appelé "adaptateur", en présence de l'ADNc simple brin polycytidinylé à son extrémité 3', s'apparie à l'"amorce"

15 générant à l'extrémité 5' de l'ADNc un site de restriction "ouvert" (voir Fig. 1). De telles molécules d'ADNc simple brin peuvent être insérées directement dans un vecteur plasmidique digéré par deux enzymes de restriction dont l'une a été polyguanylée.

20 La banque ainsi établie et comprenant 1×10^6 clones a été étalée sur filtres de nitrocellulose à raison de 2×10^4 clones par filtre. Les filtres et des répliques de ces filtres ont été préparés comme le décrivent Grunstein et Hogness (3).

On a ensuite préparé en se basant sur la séquence

25 nucléotidique du hbFGF récemment publiée (T. KUROKAWA et al. (1987), 213, 189-194) deux oligonucléotides synthétiques qui ont servi à cribler la banque. Les conditions de marquage des oligonucléotides ainsi que d'hybridation et de lavage des filtres ont été celles décrites dans "Molecular Cloning, a laboratory

30 manual" de Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1984).

(1) CATHALA et al. (1983 DNA, 2, 329-335

35 (2) CAPUT et al. (1986) PNAS USA, 83, 1670-1674

(3) GRUNDSTEIN et al. (1975) PNAS USA, 72, 3961

Les clones capables de s'hybrider simultanément avec les deux sondes synthétiques ont été recherchés. La fréquence relative de ces deux derniers était inférieure à 2×10^{-5} . On a ainsi pu isoler le clone pUC-SK1 contenant l'ADNc du hbFGF.

05

2) Détermination et analyse de la séquence de l'ADNc

L'ADN plasmidique du clone pUC-SK1 obtenu en 1) a été purifié par la méthode d'extraction alcaline. L'ADN plasmidique a été digéré par les enzymes de restriction HindIII, PstI, ECORI et BamHI par simple et double digestion. Les fragments de restriction obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Une carte d'enzymes de restriction de l'ADNc contenu dans le plasmide a été déduite (Cf. Fig.2).

10

L'ADN plasmidique a ensuite été digéré par différentes combinaisons des enzymes de restriction ci-dessus. Les fragments de restriction obtenus ont été fractionnés sur gel d'agarose 1 %. Certains de ceux-ci ont été extraits du gel (par la méthode "Gene clean" (CZYME)) puis sous-clonés dans le polylinker (polysite de clonage) de l'ADN du phage M13mp18 ou M13mp19 (Pharmacia). Les sous-clones M13 ainsi obtenus ont été séquencés par la méthode de Sanger. Les séquences d'ADN ainsi obtenues pour chacun des sous-clones ont été assemblées de façon à obtenir la séquence complète de l'ADNc du plasmide pUC-SK1 (Cf. Fig. 3).

15

20

Sur la base de la séquence de l'ADNc, la séquence complète d'acides aminés du hbFGF peut être déduite. La séquence de l'ADNc fait apparaître un seul site d'initiation potentiel usuel de la traduction du hbFGF : l'ATG en position 467, ci-après appelé ATG 467. La séquence d'acides aminés déduite à partir de ce codon d'initiation correspond à la séquence du hbFGF de 155 acides aminés déjà connue (T. KUROKAWA et al. (1987), 213, 189-194).

25

30

Cependant, la phase de lecture reste ouverte (pas de codon de terminaison de traduction) en amont de l'ATG bien qu'aucun autre ATG n'apparaisse en phase. Quatre sites d'initiation potentiels inusuels sont à relever : le CTG en position 302, 329 et 344 ; l'ACG en position 407, en phase avec l'ATG 467. Ces deux codons ont déjà été décrits comme initiateurs potentiels de

35

traduction (S.R. HANN et al. (1988) Cell, 52, 185-195 et A.C. PRATS (1989), J. Mol. Biol. (1989), 205, 0-10). La séquence de l'ADNc fait donc apparaître quatre formes longues potentielles de hbFGF. La plus longue comporte 210 acides aminés dont la séquence est déduite de l'ADNc, depuis le codon CTG en position 302 au codon de terminaison de traduction TGA en position 932. La séquence de l'ADNc est différente, en amont de l'ATG des deux autres séquences d'ADNc du hbFGF déjà publiées (J. ABRAHAM et al. (1986) EMBO J. (5 2523-2528 et T. KUROKAWA et al. (1987) Febs, 213, 1, 189-194). Elle comporte en effet un nucléotide supplémentaire, à la position 463 par rapport à la séquence publiée par KUROKAWA et à la position 369 par rapport à celle publiée par ABRAHAM. L'absence de l'un ou l'autre de ces nucléotides déphase ces codons d'initiation inusuels (à l'exception de l'ACG pour la séquence publiée par ABRAHAM) par rapport à l'ATG en position 467.

3) Transcription et traduction in vitro

Le fragment de restriction d'ADNc compris entre le site HindIII présent en amont de l'ADNc (Cf. Fig. 1) et le site ECORI en position 1711 a été purifié sur gel d'agarose 1 % par la méthode de "Gene-Clean" (OZYME). Ce fragment qui contient toute la séquence codante du hbFGF a été sous-cloné entre les sites HindIII et ECORI du polylinker du plasmide de transcription in vitro pSP64 (Promega Biotec). Le plasmide obtenu appelé pSP64hbFGF est linéarisé par l'enzyme de restriction ECORI puis transcrit en ARNhbFGF à l'aide de l'ARN polymérase SP6.

De manière similaire, différents ARN hbFGF ont été obtenus à partir de constructions où l'ADNc hbFGF sauvage a été muté ponctuellement (Cf. Fig. 4). Un premier mutant où le codon à la position 440 (codon GGA) a été changé en codon TGA (codon de terminaison), un second mutant où le codon à la position 467 (codon ATG) a été changé en codon GTC. Les deux premiers mutants ont été obtenus par la technique de mutagenèse dirigée par un oligonucléotide synthétique (4). avec utilisation de la T4 ADN polymérase

(4) (ZOLLER M.G. 1982 Nucl. Ac. Res. , 10, 6487-6500)

(Pharmacia). Un troisième et un quatrième mutant ont été obtenus où le codon CTG à la position 302 a été changé respectivement en codon TTG ou ATG. Ces deux dernières mutations ont été introduites par remplacement du fragment de restriction XhoI/NotI (position 295-319) par un oligonucléotide synthétique double brin, dans lequel la mutation à réaliser a été introduite.

Chacun des ARN hbFGF obtenus in vitro a été traduit in vitro dans un extrait de lysat de réticulocyte comme décrit ci-après. Après un traitement à la DNASEI, les ARN transcrits sont extraits deux fois avec du phénol/chloroforme, précipités avec de l'éthanol et resuspendus dans de l'eau. Les ARN, à la concentration de 10 à 20 µg/ml, ont été traduits à une température de 37°C pendant une heure par utilisation d'un système de lysat de réticulocyte de lapin (Promega Biotec) dilué deux fois en présence de 0,5 à 1 mCi/ml de méthionine (35S) (Amersham). Les protéines marquées obtenues ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS suivie d'une autoradiographie.

L'autoradiogramme obtenu est représenté sur la figure 5.

La construction avec l'ADNc hbFGF non muté fait apparaître, après transcription et traduction in vitro, 3 bandes de protéines hbFGF de poids moléculaires approximatifs de 18, 21 et 22,5 kDa (piste 2). Le remplacement de l'ATG 467 par le codon GTG abolit la synthèse de la protéine de 18 kDa mais pas celle des protéines 21 et 22,5 kDa (piste 3). L'introduction d'un codon de terminaison TGA à la position 440 en amont de l'ATG 467 abolit les protéines de 21 kDa et 22,5 kDa mais pas celle de 18 kDa (piste 4). Ces résultats montrent que, d'une part, la protéine de 18 kDa est initiée sur l'ATG 467 et, d'autre part, que les protéines de 21 et 22,5 kDa sont initiées en amont de l'ATG probablement sur deux codons d'initiation non usuels du fait qu'il n'existe pas d'autre ATG en phase ouverte en amont de l'ATG 467.

Les codons, décrits ci-dessus en 2), CTG 302, CTG 329, CTG 344 et ACG 407 sont des codons potentiels pour initier la synthèse des protéines de 21 et 22,5 kDa. L'environnement nucléotidique d'un site d'initiation de traduction décrit par KOZAK (M. KOZAK (1978) Cell., 15 1109-1123) et la taille des protéines

obtenues in vitro suggèrent que le CTG 302 et le CTG 344 sont particulièrement de bons candidats. Le remplacement du CTG 302 par TTG réduit sévèrement la synthèse de la protéine de 22,5 kDa (piste 5). D'autre part, le remplacement de CTG 302 par ATG entraîne une augmentation importante de la synthèse de la protéine de 22,5 kDa. Ces résultats montrent que la protéine de haut poids moléculaire de 22,5 kDa du hbFGF synthétisé in vitro est initiée sur le CTG en position 302. Le CTG 344 présente le même environnement nucléotidique que le CTG 302 (GAGG/CTG/GGGG), ce qui suggère fortement que le CTG 344 initie la synthèse de la protéine de 21 kDa synthétisée in vitro.

Cette étude fait donc apparaître l'existence et la caractérisation de formes du hbFGF de plus hauts poids moléculaires que celles déjà décrites et caractérisées : une première protéine primaire de 210 acides aminés initiée sur le CTG 302 et élongée jusqu'au codon de terminaison TGA 932. Une seconde protéine primaire de 196 acides aminés initiée sur le CTG 344 et élongée jusqu'au même codon de terminaison.

EXEMPLE 2 : Expression d'un gène recombinant hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés dans les microorganismes procaryotes

1) Construction du vecteur d'expression

a) principe de fonctionnement

Le vecteur d'origine est le vecteur pET-3a décrit par Rosenberg (Rosenberg et al. (1987) Gene, 56, 125-135) qui permet l'expression sélective de gènes clonés après transcription de leurs séquences codantes par l'ARN polymérase du phage T7. Cette ARN polymérase est produite par la souche E. coli réceptrice BL21/DE3 décrite par Studier (Studier W.F. et al. (1986) J. Mol. Biol., 189 113-130). Cette souche contient dans son génome le gène du phage T7 codant pour l'ARN polymérase, introduit à l'aide d'un phage λ . Le gène est sous le contrôle du promoteur la cUV5 de E. Coli permet la transcription après induction à l'IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactoside). L'ARN polymérase produite transcrit fortement et spécifiquement les gènes clonés aux sites appropriés du vecteur

pET-3a, sous le contrôle d'un promoteur du phage T7. L'unité de transcription est complétée par la séquence d'un terminateur du phage T7 placée derrière le gène et qui permet la régulation de la forte transcription.

05

b) Construction du plasmide recombinant contenant le gène hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés.

Tous les produits de restriction des séquences décrites ici sont soumis à une séparation sur gel d'agarose à 1 % ou 2 % (Sigma) en tampon TAE (tris acétate EDTA), simultanément avec un standard de poids moléculaires. Les fragments d'intérêt sont purifiés à partir de l'agarose par la méthode de "Gene Clean" (OZYME) selon les méthodes indiquées par le fournisseur. Les autres méthodes employées ainsi que les compositions des tampons et des réactifs utilisés sont celles décrites dans "Molecular Cloning, a laboratory manual" et celles indiquées par les fournisseurs.

La séquence codante du hbFGF est introduite dans le vecteur pET-3a, représenté sur la figure 6, aux sites de restrictions uniques NdeI et BamHI. La séquence d'un terminateur du phage fd (BUJARD (1981) PNAS, 78/8, 4936-4940) est placée en aval de la séquence hbFGF à l'aide de ces sites de restriction BamHI et HindIII. La séquence hbFGF est constituée en partie du fragment de restriction BssHII-HindIII dont les sites sont situés respectivement en position 325 et 1153 de l'ADNc. La séquence est complétée par un ADN synthétique constitué de deux oligodésoxyribonucléotides complémentaires formant des extrémités cohésives BssHII et NdeI compatibles avec la séquence d'ADNc hbFGF et celle du promoteur du phage T7. Les séquences de ces deux oligonucléotides sont les suivantes :

30

5' T ATG GGT GAC CGT GGT CGT GGT CG 3' et
5' CGCGCGACCACGACCACGGTCACCCA 3'

(cet artifice permet de remplacer le codon initiateur naturel CTG 302 en codon initiateur ATG et de créer un environnement nucléotidique de ce dernier plus favorable pour l'expression dans

35

E. coli). Les séquences synthétiques sont chauffées à 100°C pendant une minute dans un volume réactionnel de 10 µl à une concentration de 15 µg/ml en tampon Tris-HCl pH : 7,5 10 mM/NaCl 50 mM. On laisse refroidir graduellement jusqu'à température du laboratoire de façon à hybrider les deux oligonucléotides. On conserve dans la glace.

Les quatre séquences ADN décrites ci-dessus sont assemblées in vitro dans un volume réactionnel de 30 µl et 6 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Pharmacia). Les séquences sont mélangées dans un rapport molaire à l'ADN vecteur, de 2 pour la séquence hbFGF et celle du terminateur du phage fd et de 100 pour la séquence synthétique. La réaction a été réalisée à une température de 15°C pendant 16 heures.

Le produit de la réaction est mis en contact avec environ 10^8 cellules de la souche E. coli MC 1061 décrite par Casadaban M.J. (Casadaban M.J. et al., J. of bact. 143/2-1980, 917-981), préalablement traitées au chlorure de calcium 50 mM. Les cellules transformées sont étalées sur boîtes de milieu L solide additionné de 100 µg/ml d'ampicilline. On laisse incuber 16 heures à 37°C. Douze colonies isolées sont mises en culture en milieu L additionné d'ampicilline à 100 µg/ml final jusqu'à la phase stationnaire. Les plasmides sont purifiés par la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim H.C. et Doly J. (Nuc. Ac. Res., 7-1979). Les plasmides sont analysés par les enzymes de restriction BssHII, NdeI, BamHI et BstEII et sélectionnés après analyse sur gel d'agarose d'après le profil théorique des fragments à obtenir.

Le clone retenu est nommé 409.2. Il contient par construction le plasmide 409.2 représenté sur la figure 7 qui comprend la séquence codante du hbFGF 210 représentée sur la figure 8 (qui précise également la séquence d'acides aminés codée).

30

2) Expression dans E. coli de l'ADNc du gène recombinant hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés

Le plasmide 409.2 est utilisé pour transformer la souche E. coli BL21/DE3 mentionnée ci-dessus, préalablement traitée au chlorure de calcium 50 mM. Les cellules sont étalées selon la procédure décrite précédemment.

35

Une colonie est mise en culture en milieu L additionné de 100 µg/ml d'ampicilline. La culture est effectuée à une température de 37°C sous agitation à 180 tr/min jusqu'à une densité optique de 1 mesurée à 600 nm. On centrifuge alors en tube de 1,5 ml un volume contenant $2 \cdot 10^8$ cellules qui constitue l'échantillon témoin avant induction.

On induit l'expression de l'ADNc codant pour le hbFGF 210, en rajoutant à la culture 1 mM d'IPTG. On incube pendant 2 heures à une température de 37°C. On centrifuge un volume contenant $2 \cdot 10^8$ cellules qui constitue l'échantillon induit.

Les culots bactériens des différents échantillons sont repris dans 20 µl d'un tampon Tris-HCl pH : 6,8 ; 60 mM/SDS 2 %/Glycérol 10 %/β2 mercaptoéthanol 0,5 %/bleu de bromophénol 0,05 %. On fait bouillir 10 min et on conserve dans la glace. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 12,5 % contenant du SDS d'après les procédures décrites par Laemmli U.K. (Nature, 227, 1970, 680-685). La séparation est effectuée pendant 5 heures à 150 volts en présence d'un standard de poids moléculaire et de FGF basique témoin (la forme 146 acides aminés). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Biorad) par électrotransfert en tampon Tris 20 mM/Glycine 150 mM et Méthanol 20 % pendant 3 heures avec une intensité de 200 mA et à une température de 10°C. La membrane est mise à saturer après transfert dans du tampon Al (Tris-HCl pH : 7,4/NaCl 0,9 %) et BSA 3 % (Bovine Serum Albumine) pendant 16 heures à une température de 20°C. La membrane est ensuite placée dans 30 ml de tampon Al/BSA 3 % auquel on rajoute 60 µl d'un sérum de lapin immunisé par le FGF basique purifié (forme 146 acides aminés). On incube pendant 90 min à une température de 37°C. On lave la membrane 3 fois pendant 10 min avec 150 ml de tampon Al, 3 fois pendant 10 min avec 150 ml de tampon Al/NP40 0,05 % et de nouveau 3 fois pendant 10 min avec 150 ml de tampon Al. Les complexes antigènes-anticorps sont révélés par incubation de la membrane dans 30 ml de tampon Al/BSA 3 % avec 3 µCi (111 KBq) de protéine A-I¹²⁵. (Réf. NEN) pendant 1 heure à 20°C. On effectue ensuite les lavages comme décrit précédemment.

La membrane est soumise à une autoradiographie : une bande supplémentaire d'environ 22 kDa apparaît dans l'échantillon induit.

3) Purification du hbFGF par chromatographie d'affinité

05 Une culture de 1 litre de la souche d'E. coli BL21/DE3 transformée par le plasmide 409.2 est effectuée dans des conditions identiques à celles décrites en 2). Après induction, les cultures sont centrifugées à 5 000 g pendant 10 min et les culots de bactéries lavés avec un même volume de tampon phosphate 0,1 M
10 pH : 6 et à nouveau centrifugés à 5 000 g pendant 10 min. Les culots sont conservés à une température de -20° .

Le culot cellulaire est resuspendu dans 50 ml d'une solution Tris-HCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 0,65M/0,25 % BSA/Leupeptine (peptide Institut) 1 mg par ml/Iniprol (Aprotinine) (Calbiochem)
15 1 %/Pepstatine A (Sigma) 150 μ M/Soybean 0,1 mg par ml/EDTA 1 mM/Phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) 2 mM. La suspension a été soumise à une ultrasonication, puis centrifugée à 3 000 tr/min. Le surnageant a été récupéré puis incubé 1 heure à la température de 37°C en présence de DNase I à 6 mg/ml. Le surnageant a été
20 additionné de 40 ml de la solution décrite ci-dessus, puis appliqué sur une colonne d'héparine sépharose de 10 ml préalablement tamponnée avec une solution Tris HCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 0,65 M/EDTA 1 mM. La colonne a été lavée avec cette même solution puis avec une solution TrisHCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 1 M/EDTA 1 mM. L'hbFGF a été
25 éluée avec 10 ml d'une solution Tris HCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 2 M/EDTA 0,3 mM en fractions de 1 ml.

Un échantillon de chacune des fractions d'élution a été soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 14 % en présence de SDS. Les protéines du gel ont été révélées par la
30 technique de coloration à l'argent (Biorad). Les fractions contenant une bande de 22,5 kDa ont été rassemblées. Un échantillon du pool obtenu a été analysé sur un gel de polyacrylamide (Cf. Fig. 13). La concentration d'hbFGF ainsi purifiée a été estimée à 20 μ g/ml (volume total 10 ml), par comparaison avec du bFGF de 146
35 acides aminés déjà quantifié.

4) Détermination de la séquence amino terminale du hbFGF

500 µl du hbFGF purifié en 3) ont été injectés sur une colonne HPLC (2,1 x 100 mm) de phase inverse (Brownlee). Un gradient continu de 1 à 60 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide trifluoroacétique, a été appliqué pendant 10 min. La détection de l'éluat a été réalisée à 220 nm. Le profil d'élution présente cinq pics F₁, F₂, F₃, F₄, F₅ (Cf. Fig. 14). La surface du pic F₂ (pic majoritaire) représente plus de 70 % de la somme des surfaces des cinq pics d'élution. La fraction protéique correspondant au pic d'élution F₂ a été récoltée (4 à 8 µg de protéine) et séquencée à partir de l'extrémité amino terminale sur un séquenceur 470 A d'Applied Biosystems. La séquence protéique amino terminale suivante 55 acides aminés a ainsi été obtenue :

GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArg X ThrAlaAlaProArg
 AlaAlaProAlaAlaArg X X ArgProGlyProAla X X Met

(dans la séquence ci-dessus, X représente les acides aminés non déterminés).

Cette séquence est identique, comme attendu, à celle déduite du gène recombinant hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés (Cf. Fig. 8), à l'exception du premier acide aminé de cette dernière, la méthionine d'initiation, absente ici à l'extrémité amino terminale. Celle-ci a donc probablement été éliminée au cours d'un processus de maturation post-traductionnel.

5) Détermination de l'activité mitogène du hbFGF

L'activité mitogène du hbFGF purifié en 3) a été déterminée sur des cellules endothéliades aortiques de bovin (ABAE) comme suit : les cellules ont été étalées à $1,5 \times 10^4$ cellules par boîte de 35 mm de diamètre dans du DMEM (milieu d'Eagle modifié par Dulbecco) additionné de 10 % de sérum de veau (Seromed). Du hbFGF de 22,5 kDa a été ajouté dans le milieu tous les deux jours. L'activité mitogène a été déterminée par comptage des cellules

ABAE, à l'aide d'un compteur à cellules (Coultronic) cinq jours après l'étalement. Un témoin positif a été réalisé avec du bFGF recombinant (E. coli) de 17 kDa (146 acides aminés).

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 9.

05 Celle-ci montre que la forme lourde du hbFGF de 22,5 kDa produite à partir du gène recombinant exprimé dans E. coli est biologiquement active.

10 EXEMPLE 3 : Expression de gènes recombinants hbFGF dans les cellules eucaryotes pour démontrer la réalité biologique de l'initiation sur les codons non usuels mis en évidence dans l'exemple 1

1) Construction des vecteurs d'expression

15 Le fragment de restriction de l'ADNc hbFGF entre dans le site HindIII présent en amont de l'ADNc (Cf. Fig. 1) et le site BalI (position 943) a été purifié sur gel d'agarose 1 % par la méthode "Gene Clean" (OZYME). Le site cohésif HindIII a été partiellement rempli par action de l'ADN polymérase de T4
20 (Pharmacia) en présence de nucléotides dATP et dGTP. Ce fragment a été sous-cloné dans le polylinker de l'ADN du vecteur d'expression de l'ADN polymérase de T4 en présence de nucléotides dCTP et dTTP, et le site SmaI. La construction obtenue est appelée pSVLhbFGF ATG⁺ (Cf. Fig. 10). Une seconde construction a été réalisée de
25 manière identique mais avec un ADNc hbFGF muté, dans lequel le codon ATG 467 a été remplacé par le codon GTG par mutagenèse dirigée par un oligonucléotide synthétique, comme décrit dans l'exemple 1-3). La construction plasmidique obtenue est appelée pSVL hbFGF ATG⁻. Une troisième construction similaire au plasmide
30 pSVL hbFGF ATG⁺, mais dans laquelle la partie de l'ADNc hbFGF située en amont du site ApaI (position 455) a été délétée, a été réalisée. Elle est nommée pSVLhbFGFΔ.

2) Transfection dans les cellules COS-3

35 Les cellules de singe COS-3 ont été cultivées dans des boîtes de 100 mm de diamètre dans le milieu d'Eagle modifié par

Dulbecco (DMEM), additionné de 10 % de sérum foetal de veau (Gibco BRL) à une température de 37°C et en présence de 5 % de gaz carbonique. 1,5 à 2 x 10⁶ cellules COS ont été transfectées avec 20 µg d'ADN plasmidique (pSVL hbFGF ATG⁺, pSVL hbFGF ATG⁻ ou pSVL hbFGFΔ) dans 5 ml de DMEM/10 % de sérum foetal de veau/200 µg/ml de Di-éthylaminoéthyl-dextran/100 µM en chloroquine. Après une incubation de 5 heures, à une température de 37°C, le mélange de transfection est enlevé. Les cellules sont rincées avec une solution de tampon phosphate (PBS) et traitées pendant une minute avec une solution de PBS à 10 % de diméthylsulfoxyde puis rincées à nouveau deux fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite incubées pendant 65 heures dans du DMEM à 0,5 % de sérum foetal de veau.

Les cellules COS transfectées ont été décollées mécaniquement et soumises à une centrifugation. Les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec du PBS, resuspendus à la concentration du 10⁷ cellules/ml dans du PBS additionné de 0,2 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Après lyse par ultrasons, les extraits ont été centrifugés à 12 000 g et les culots éliminés.

3) Analyse des extraits de cellules COS par électrophorèse et révélation à l'aide du sérum de lapin immunisé contre du bFGF (Cf. exemple 2.2)) : 25 µl des extraits de cellules COS préparées en 2) ont été fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS. Les protéines du gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose par la technique d'électrotransfert. La membrane est incubée avec le sérum. Les complexes anticorps-antigènes sont révélés par de la protéine A radiomarquée à l'iode 125 (NEN). Une autoradiographie de la membrane a été réalisée.

L'autoradiogramme est reproduit sur la figure 11.

Pour l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁺ (piste 3), on observe une bande dominante de 18 kDa approximativement et plusieurs bandes mineures de plus haut poids moléculaire. Ces mêmes bandes mineures sont retrouvées, avec la même intensité, pour l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁻ (piste 4). Du fait du remplacement du codon ATG à la position 467 par un codon GTG, la bande de 18 kDa

est fortement diminuée, dans cet extrait. Seule la bande de 18 kDa (dédoublée) est présente pour l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGFΔ (piste 5).

05 L'autoradiogramme révèle d'autre part que l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁺ renferme une quantité globale d'hbFGF beaucoup plus importante que l'extrait des cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁻.

10 4) Détermination de l'activité mitogène des extraits de cellules COS transfectées.

15 L'activité mitogène des extraits obtenus en 2) a été déterminée sur des cellules endothéliales aortiques de bovin (ABAE) comme suit : les cellules ont été étalées à 2×10^4 cellules par boîte de 35 mm de diamètre dans du milieu DMEM additionné de 10 % de sérum de veau (Seromed). 2,5 µl de chaque extrait COS ont été ajoutés tous les deux jours. L'activité mitogène a été déterminée par comptage de cellules ABAE cinq jours après l'étalement. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1 ci-après.

20 TABEAU 1 : Activité mitogène des extraits des cellules COS transfectées

25	Echantillon ajouté au milieu de cellules ABAE	Nombres de cellules par boîte après 5 Jours
	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL hbFGF ATG ⁺	$7,3 \times 10^5$
30	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL hbFGF ATG ⁻	$9,1 \times 10^5$
35	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL hbFGFΔ	$8,7 \times 10^5$

	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL (témoin négatif)	$2,5 \times 10^5$
05	1 ng de bFGF recombinant de 17 kDa (146 acides aminés) produit dans <i>Escherichia coli</i> (témoin positif)	$8,7 \times 10^5$
10	Pas d'adjonction	$1,2 \times 10^5$

Le tableau 1 montre que l'extrait de cellules transfectées par pSVL hbFGF ATG⁻ est capable de stimuler la division cellulaire des cellules endothéliales ABAB. L'ATG à la position 467 n'est donc pas indispensable à la synthèse de hbFGF biologiquement actif. Ce résultat, dans les cellules eucaryotes, corrobore ceux développés dans l'exemple 1, dans lequel il est démontré in vitro l'existence de codons initiateurs de traduction non usuels en amont de l'ATG 467.

D'autre part, il apparaît que l'activité mise en évidence dans l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁻ est voisine, voire meilleure, que celle décelée dans l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁺. Or le premier extrait contient une quantité globale d'hbFGF très inférieure à celle du deuxième extrait (Cf. 3) ci-dessus). Ces résultats montrent une activité mitogène des formes de hbFGF de haut poids moléculaire mises en évidence par les bandes mineures de l'autoradiogramme présenté en 3) ci-dessus.

5) Capacité des extraits à stimuler la synthèse d'ADN dans les cellules BALB/C 3T3.

Les cellules BALB/C 3T3 ont été cultivées dans des plaques de microtitration de 96 puits dans du milieu DMEM additionné de 10 % de sérum foetal de veau. Après 7 jours de

culture, le milieu de culture des cellules BALB/C 3T3 en phase stationnaire a été additionné de thymidine tritiée (H_3) (Amersham) et de volumes variables d'extraits de cellules COS préparées en 2). Après 48 heures d'incubation, les cellules BALB/C 3T3 ont été collectées par action de la trypsine et la quantité de thymidine (H_3) incorporée a été mesurée.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans la figure 12. Il apparaît que l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG⁻ est capable de stimuler la synthèse d'ADN des cellules BALB/C 3T3, résultat qui corrobore ceux développés en 4) ci-dessus où il est établi que cet extrait est capable de stimuler la division cellulaire des cellules endothéliales ABAE.

Cette étude (exemple 3) a été réalisée en maintenant les codons d'initiation non usuels peu efficaces, notamment les CTG 302 et CTG 344, afin de mettre en évidence la réalité biologique de l'initiation de la traduction sur ces codons, déjà démontrée in vitro dans l'exemple 1. Il est évident pour l'homme du métier que dans un but de surproduction d'une forme lourde du hbFGF le codon d'initiation usuel ATG (plus efficace) sera utilisé dans le gène recombinant, comme cela a été fait pour produire la forme de 209 acides aminés dans Escherichia coli (Cf. exemple 2 ci-dessus).

REVENDICATIONS

1. Gène recombinant comportant une séquence d'ADN codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes, caractérisé en ce que celle-ci code pour une protéine dont la séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,

- en amont de cette sous-séquence une deuxième sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement une méthionine.

2. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est choisi parmi la méthionine, la valine, la leucine et l'isoleucine.

3. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa séquence d'ADN code pour une protéine dont la séquence est constituée de la séquence ci-après :

GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer
 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
 05 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAnsGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
 10 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer,

précédée éventuellement d'une méthionine.

4. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa
 15 séquence d'ADN code pour une protéine dont la séquence est
 constituée de la séquence ci-après :

GlyGlyArgGlyArg
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
 20 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer
 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAnsGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
 25 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer,

30 précédée éventuellement d'une méthionine.

5. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa
 séquence d'ADN comprend une première sous-séquence :

W₁ W₂ W₃ GCAGCCGGGAGC
 35 ATCACCACGCTGCCCCGCTTGCCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCTTCCCGCCCGGCCAC
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCC

GACGGCCGAGTTGACGGGCTCCGGGAGAAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACCTTCAA
 GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG
 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTCTTTTTTGA
 CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACAGTTGGTATGTG
 05 GCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT
 ATACTTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

dans laquelle W_1, W_2, W_3 représentent un codon susceptible d'être
 traduit en méthionine, valine, leucine ou isoleucine,
 10 en amont de cette sous-séquence une deuxième sous-séquence consti-
 tuée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont
 d'un nombre entier de codons et comportant plus de deux codons de
 la suite :

15 CTGGGGGACCGCGGGCGCGGCCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGAGGGACC

et en amont de cette deuxième sous-séquence un codon ATG.

20 6. Gène selon la revendication 5 caractérisé en ce que la
 deuxième sous-séquence est l'une des sous-séquences ci-après :

25 GGGGACCGCGGGCGCGGCCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGAGGGACC

et

GGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGAGGGACC

30

7. Gène selon la revendication 3, caractérisé en ce que sa
 séquence d'ADN est la suivante :

35 ATGGGTGACCGTGGTCTGCTGCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGAGGGACCATGGCAGCCGGGAGC

ATCACCACGCTGCCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCAC
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTAETGCAAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCC
 GACGSCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAA
 GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG
 05 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTGTAA
 CGATTGGAATCTAATACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTG
 GCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT
 ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

10 8. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il porte, avec
 les moyens nécessaires à son expression, une séquence selon l'une
 des revendications 1 à 7.

9. Cellules eucaryotes, caractérisées en ce qu'elles sont
 transfectées par un vecteur d'expression selon la revendication 8.

15 10. Microorganismes procaryotes, caractérisés en ce qu'ils
 contiennent un vecteur d'expression selon la revendication 8.

11. Microorganismes procaryotes selon la revendication 10,
 caractérisés en ce qu'ils appartiennent à l'espèce *Escherichia*
coli.

20 12. Facteur basique de croissance des fibroblastes, caracté-
 risé en ce que sa séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
 25 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
 30 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés
 du code génétique,

en amont de cette sous-séquence une seconde sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

05 LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette sous-séquence éventuellement une méthionine.

10 13. Facteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que sa séquence est constituée de la séquence suivante :

15 GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
20 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer,

25 précédée éventuellement d'une méthionine.

14. Facteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que sa séquence est constituée de la séquence suivante :

30 GlyGlyArgGlyArg
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln
35 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu

ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

05 précédée éventuellement d'une méthionine.

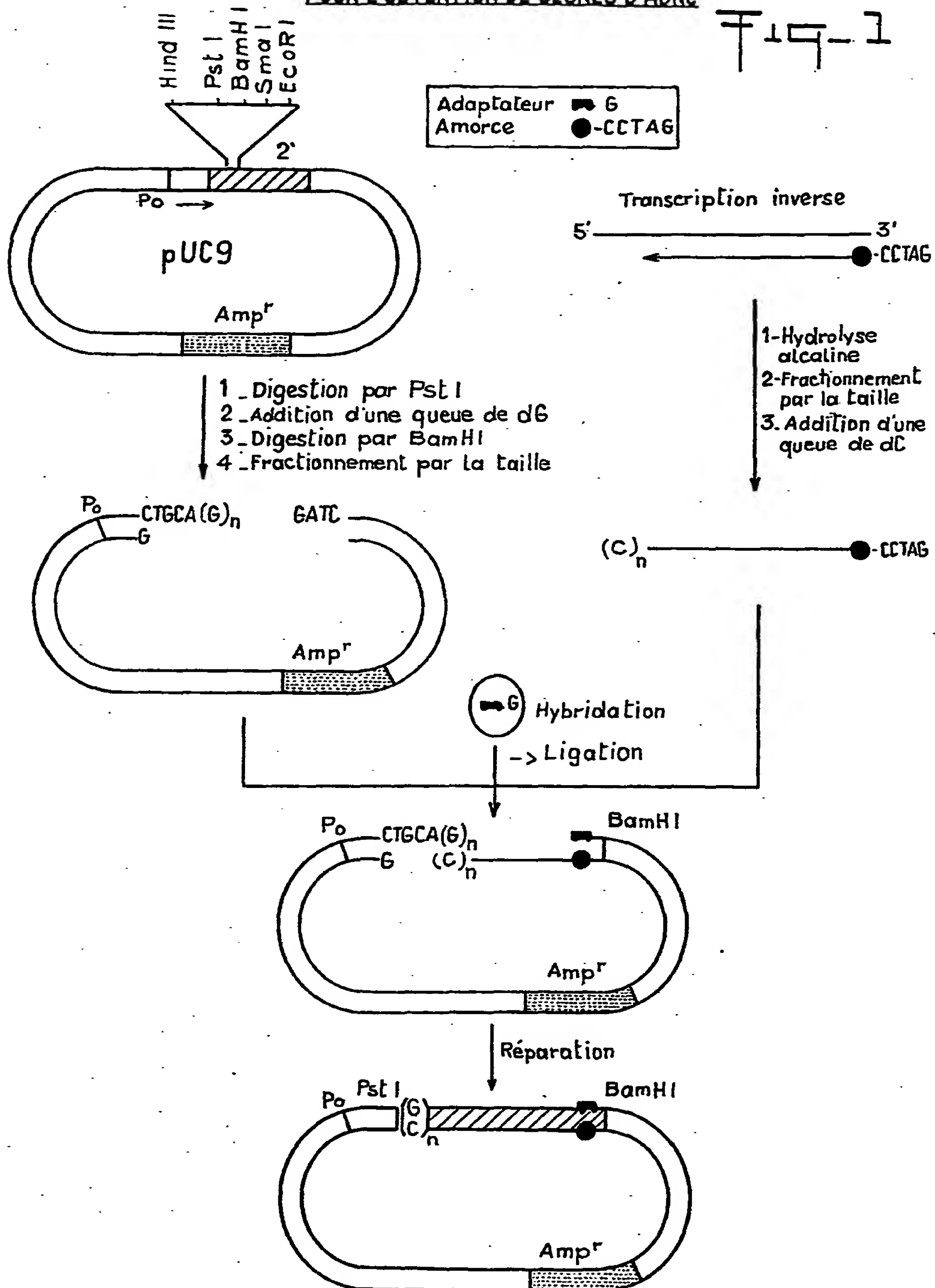
15. Médicament, caractérisé en ce qu'il contient un facteur
basique de croissance selon l'une des revendications 12 à 14.

1/14

TECHNIQUE DE L' "AMORCE-ADAPTATEUR"

POUR L'OBTENTION DE CLONES D'ADNC

Fig-1

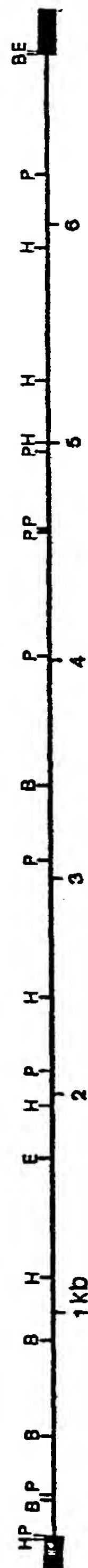


2642086

2/14

Fig-2

CARTE D'ENZYMES DE RESTRICTION DE L'ADNC hbfGE
DU PLASMIDE pUC-SK1



B = BamH I
P = Pst I
H = Hind III
E = EcoR I

250 PB

F15-3

Les sites potentiels de polyadenylation sont soulignés.
Les codons fléchés sont trois codons potentiels
d'initiation de la traduction.

SEQUENCE DE L'ADNC HbGF DU PLASHIDE PUC-SK1
ET SEQUENCE PROTEIQUE DEDUITE

1
41
121
181
241
301
361
421
481
541
601
661
721
781
841
901
961
1021
1081
1141
1201
1261
1321
1381
1441
1501
1561
1621
1681
1741
1801
1861
1921
1981
2041
2101
2161
2221
2281
2341
2401
2461
2521
2581
2641
2701
2761
2821
2881
2941
3001
3061
3121
3181
3241
3301
3361
3421
3481
3541
3601
3661
3721
3781
3841
3901
3961
4021
4081
4141
4201
4261
4321
4381
4441
4501
4561
4621
4681
4741
4801
4861
4921
4981
5041
5101
5161
5221
5281
5341
5401
5461
5521
5581
5641
5701
5761
5821
5881
5941
6001
6061
6121
6181
6241
6301
6361
6421
6481
6541
6601
6661
6721
6781
6841
6901
6961
7021
7081
7141
7201
7261
7321
7381
7441
7501
7561
7621
7681
7741
7801
7861
7921
7981
8041
8101
8161
8221
8281
8341
8401
8461
8521
8581
8641
8701
8761
8821
8881
8941
9001
9061
9121
9181
9241
9301
9361
9421
9481
9541
9601
9661
9721
9781
9841
9901
9961
10021
10081
10141
10201
10261
10321
10381
10441
10501
10561
10621
10681
10741
10801
10861
10921
10981
11041
11101
11161
11221
11281
11341
11401
11461
11521
11581
11641
11701
11761
11821
11881
11941
12001
12061
12121
12181
12241
12301
12361
12421
12481
12541
12601
12661
12721
12781
12841
12901
12961
13021
13081
13141
13201
13261
13321
13381
13441
13501
13561
13621
13681
13741
13801
13861
13921
13981
14041
14101
14161
14221
14281
14341
14401
14461
14521
14581
14641
14701
14761
14821
14881
14941
15001
15061
15121
15181
15241
15301
15361
15421
15481
15541
15601
15661
15721
15781
15841
15901
15961
16021
16081
16141
16201
16261
16321
16381
16441
16501
16561
16621
16681
16741
16801
16861
16921
16981
17041
17101
17161
17221
17281
17341
17401
17461
17521
17581
17641
17701
17761
17821
17881
17941
18001
18061
18121
18181
18241
18301
18361
18421
18481
18541
18601
18661
18721
18781
18841
18901
18961
19021
19081
19141
19201
19261
19321
19381
19441
19501
19561
19621
19681
19741
19801
19861
19921
19981
20041
20101
20161
20221
20281
20341
20401
20461
20521
20581
20641
20701
20761
20821
20881
20941
21001
21061
21121
21181
21241
21301
21361
21421
21481
21541
21601
21661
21721
21781
21841
21901
21961
22021
22081
22141
22201
22261
22321
22381
22441
22501
22561
22621
22681
22741
22801
22861
22921
22981
23041
23101
23161
23221
23281
23341
23401
23461
23521
23581
23641
23701
23761
23821
23881
23941
24001
24061
24121
24181
24241
24301
24361
24421
24481
24541
24601
24661
24721
24781
24841
24901
24961
25021
25081
25141
25201
25261
25321
25381
25441
25501
25561
25621
25681
25741
25801
25861
25921
25981
26041
26101
26161
26221
26281
26341
26401
26461
26521
26581
26641
26701
26761
26821
26881
26941
27001
27061
27121
27181
27241
27301
27361
27421
27481
27541
27601
27661
27721
27781
27841
27901
27961
28021
28081
28141
28201
28261
28321
28381
28441
28501
28561
28621
28681
28741
28801
28861
28921
28981
29041
29101
29161
29221
29281
29341
29401
29461
29521
29581
29641
29701
29761
29821
29881
29941
30001
30061
30121
30181
30241
30301
30361
30421
30481
30541
30601
30661
30721
30781
30841
30901
30961
31021
31081
31141
31201
31261
31321
31381
31441
31501
31561
31621
31681
31741
31801
31861
31921
31981
32041
32101
32161
32221
32281
32341
32401
32461
32521
32581
32641
32701
32761
32821
32881
32941
33001
33061
33121
33181
33241
33301
33361
33421
33481
33541
33601
33661
33721
33781
33841
33901
33961
34021
34081
34141
34201
34261
34321
34381
34441
34501
34561
34621
34681
34741
34801
34861
34921
34981
35041
35101
35161
35221
35281
35341
35401
35461
35521
35581
35641
35701
35761
35821
35881
35941
36001
36061
36121
36181
36241
36301
36361
36421
36481
36541
36601
36661
36721
36781
36841
36901
36961
37021
37081
37141
37201
37261
37321
37381
37441
37501
37561
37621
37681
37741
37801
37861
37921
37981
38041
38101
38161
38221
38281
38341
38401
38461
38521
38581
38641
38701
38761
38821
38881
38941
39001
39061
39121
39181
39241
39301
39361
39421
39481
39541
39601
39661
39721
39781
39841
39901
39961
40021
40081
40141
40201
40261
40321
40381
40441
40501
40561
40621
40681
40741
40801
40861
40921
40981
41041
41101
41161
41221
41281
41341
41401
41461
41521
41581
41641
41701
41761
41821
41881
41941
42001
42061
42121
42181
42241
42301
42361
42421
42481
42541
42601
42661
42721
42781
42841
42901
42961
43021
43081
43141
43201
43261
43321
43381
43441
43501
43561
43621
43681
43741
43801
43861
43921
43981
44041
44101
44161
44221
44281
44341
44401
44461
44521
44581
44641
44701
44761
44821
44881
44941
45001
45061
45121
45181
45241
45301
45361
45421
45481
45541
45601
45661
45721
45781
45841
45901
45961
46021
46081
46141
46201
46261
46321
46381
46441
46501
46561
46621
46681
46741
46801
46861
46921
46981
47041
47101
47161
47221
47281
47341
47401
47461
47521
47581
47641
47701
47761
47821
47881
47941
48001
48061
48121
48181
48241
48301
48361
48421
48481
48541
48601
48661
48721
48781
48841
48901
48961
49021
49081
49141
49201
49261
49321
49381
49441
49501
49561
49621
49681
49741
49801
49861
49921
49981
50041
50101
50161
50221
50281
50341
50401
50461
50521
50581
50641
50701
50761
50821
50881
50941
51001
51061
51121
51181
51241
51301
51361
51421
51481
51541
51601
51661
51721
51781
51841
51901
51961
52021
52081
52141
52201
52261
52321
52381
52441
52501
52561
52621
52681
52741
52801
52861
52921
52981
53041
53101
53161
53221
53281
53341
53401
53461
53521
53581
53641
53701
53761
53821
53881
53941
54001
54061
54121
54181
54241
54301
54361
54421
54481
54541
54601
54661
54721
54781
54841
54901
54961
55021
55081
55141
55201
55261
55321
55381
55441
55501
55561
55621
55681
55741
55801
55861
55921
55981
56041
56101
56161
56221
56281
56341
56401
56461
56521
56581
56641
56701
56761
56821
56881
56941
57001
57061
57121
57181
57241
57301
57361
57421
57481
57541
57601
57661
57721
57781
57841
57901
57961
58021
58081
58141
58201
58261
58321
58381
58441
58501
58561
58621
58681
58741
58801
58861
58921
58981
59041
59101
59161
59221
59281
59341
59401
59461
59521
59581
59641
59701
59761
59821
59881
59941
60001
60061
60121
60181
60241
60301
60361
60421
60481
60541
60601
60661
60721
60781
60841
60901
60961
61021
61081
61141
61201
61261
61321
61381
61441
61501
61561
61621
61681
61741
61801
61861
61921
61981
62041
62101
62161
62221
62281
62341
62401
62461
62521
62581
62641
62701
62761
62821
62881
62941
63001
63061
63121
63181
63241
63301
63361
63421
63481
63541
63601
63661
63721
63781
63841
63901
63961
64021
64081
64141
64201
64261
64321
64381
64441
64501
64561
64621
64681
64741
64801
64861
64921
64981
65041
65101
65161
65221
65281
65341
65401
65461
65521
65581
65641
65701
65761
65821
65881
65941
66001
66061
66121
66181
66241
66301
66361
66421
66481
66541
66601
66661
66721
66781
66841
66901
66961
67021
67081
67141
67201
67261
67321
67381
67441
67501
67561
67621
67681
67741
67801
67861
67921
67981
68041
68101
68161
68221
68281
68341
68401
68461
68521
68581
68641
68701
68761
68821
68881
68941
69001
69061
69121
69181
69241
69301
69361
69421
69481
69541
69601
69661
69721
69781
69841
69901
69961
70021
70081
70141
70201
70261
70321
70381
70441
70501
70561
70621
70681
70741
70801
70861
70921
70981
71041
71101
71161
71221
71281
71341
71401
71461
71521
71581
71641
71701
71761
71821
71881
71941
72001
72061
72121
72181
72241
72301
72361
72421
72481
72541
72601
72661
72721
72781
72841
72901
72961
73021
73081
73141
73201
73261
73321
73381
73441
73501
73561
73621
73681
73741
73801
73861
73921
73981
74041
74101
74161
74221
74281
74341
74401
74461
74521
74581
74641
74701
74761
74821
74881
74941
75001
75061
75121
75181
75241
75301
75361
75421
75481
75541
75601
75661
75721
75781
75841
75901
75961
76021
76081
76141
76201
76261
76321
76381
76441
76501
76561
76621
76681
76741
76801
76861
76921
76981
77041
77101
77161
77221
77281
77341
77401
77461
77521
77581
77641
77701
77761
77821
77881
77941
78001
78061
78121
78181
78241
78301
78361
78421
78481
78541
78601
78661
78721
78781
78841
78901
78961
79021
79081
79141
79201
79261
79321
79381
79441
79501
79561
79621
79681
79741
79801
79861
79921
79981
80041
80101
80161
80221
80281
80341
80401
80461
80521
80581
80641
80701
80761
80821
80881
80941
81001
81061
81121
81181
81241
81301
81361
81421
81481
81541
81601
81661
81721
81781
81841
81901
81961
82021
82081
82141
82201
82261
82321
82381
82441
82501
82561
82621
82681
82741
82801
82861
82921
82981
83041
83101
83161
83221
83281
83341
83401
83461
83521
83581
83641
83701
83761
83821
83881
83941
84001
84061
84121
84181
84241
84301
84361
84421
84481
84541
84601
84661
84721
84781
84841
84901
84961
85021
85081
85141
85201
85261
85321
85381
85441
85501
85561
85621
85681
85741
85801
85861
85921
85981
86041
86101
86161
86221
86281
86341
86401
86461
86521
86581
86641
86701
86761
86821
86881
86941
87001
87061
87121
87181
87241
87301
87361
87421
87481
87541
87601
87661
87721
87781
87841
87901
87961
88021
88081
88141
88201
88261
88321
88381
88441
88501
88561
88621
88681
88741
88801
88861
88921
88981
89041
89101
89161
89221
89281
89341
89401
89461
89521
89581
89641
89701
89761
89821
89881
89941
90001
90061
90121
90181
90241
90301
90361
90421
90481
90541
90601
90661
90721
90781
90841
90901
90961
91021
91081
91141
91201
91261
91321
91381
91441
91501
91561
91621
91681
91741
91801
91861
91921
91981
92041
92101
92161
92221
92281
92341
92401
92461
92521
92581
92641
92701
92761
92821
92881
92941
93001
93061
93121
93181
93241
93301
93361
93421
93481
93541
93601
93661
93721
93781
93841
93901
93961
94021
94081
94141
94201
94261
94321
94381
94441
94501
94561
94621
94681
94741
94801
94861
94921
94981
95041
95101
95161
95221
95281
95341
95401
95461
95521
95581
95641
95701
95761
95821
95881
95941
96001
96061
96121
96181
96241
96301
96361
96421
96481
96541
96601
96661
96721
96781
96841
96901
96961
97021
97081
97141
97201
97261
97321
97381
97441
97501
97561
97621
97681
97741
97801
97861
97921
97981
98041
98101
98161
98221
98281
98341
98401
98461
98521
98581
98641
98701
98761
98821
98881
98941
99001
99061
99121
99181
99241
99301
99361
99421
99481
99541
99601
99661
99721
99781
99841
99901
100001
1000061
1000121
1000181
1000241
1000301
1000361
1000421
1000481
1000541
1000601
1000661
1000721
1000781
1000841
1000901
1000961
1001021
1001081
1001141
1001201
1001261
1001321
1001381
1001441
1001501
1001561
1001621
1001681
1001741
1001801
1001861
1001921
1001981
1002041
1002101
1002161
1002221
1002281
1002341
1002401
1002461
1002521
1002581
1002641
1002701
1002761
1002821
1002881
1002941
1003001
1003061
1003121
1003181
1003241
1003301
1003361
1003421
1003481
1003541
1003601
1003661
1003721
1003781
1003841
1003901
1003961
1004021
1004081
1004141

F-19-4

290 ATC
 TTC
 ACCCGGCTCGAGGTGGGGGACCGCGCGCGCGCGCGCTGCCCGCGCGGAGGCTGGGGGGCCGGGCGGGGCGTGCCCCGAGCGGGTCGGAGGC
 LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArgGlyArgAlaProGluArgValGlyGly

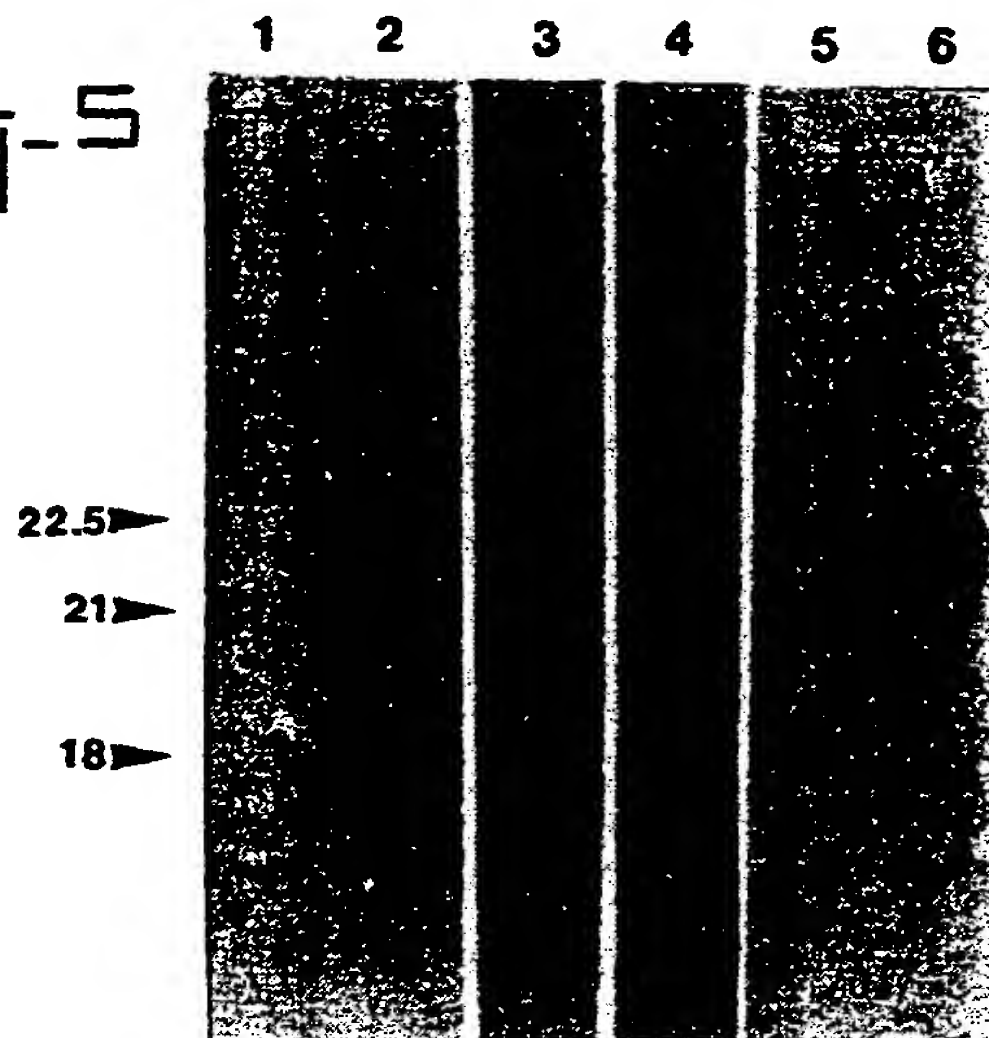
 389 TGA GTC 480
 TCGCGCGCGCGCGCGCGCGGACCGCGGCTCCCCGCGCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCCGCAGGGACCATTGCCAGCCGGGAGCATCAC
 ArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArgAlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySerIleThr

les acides aminés soulignés positionnent trois sites potentiels d'initiation de traduction.

5/14

TRADUCTION IN VITRO D'ARN hbFGF OBTENUS
PAR TRANSCRIPTION IN VITRO D'ADNc hbFGF

Fig-5



1 - témoin négatif

2 - ADNc hbFGF sans mutation

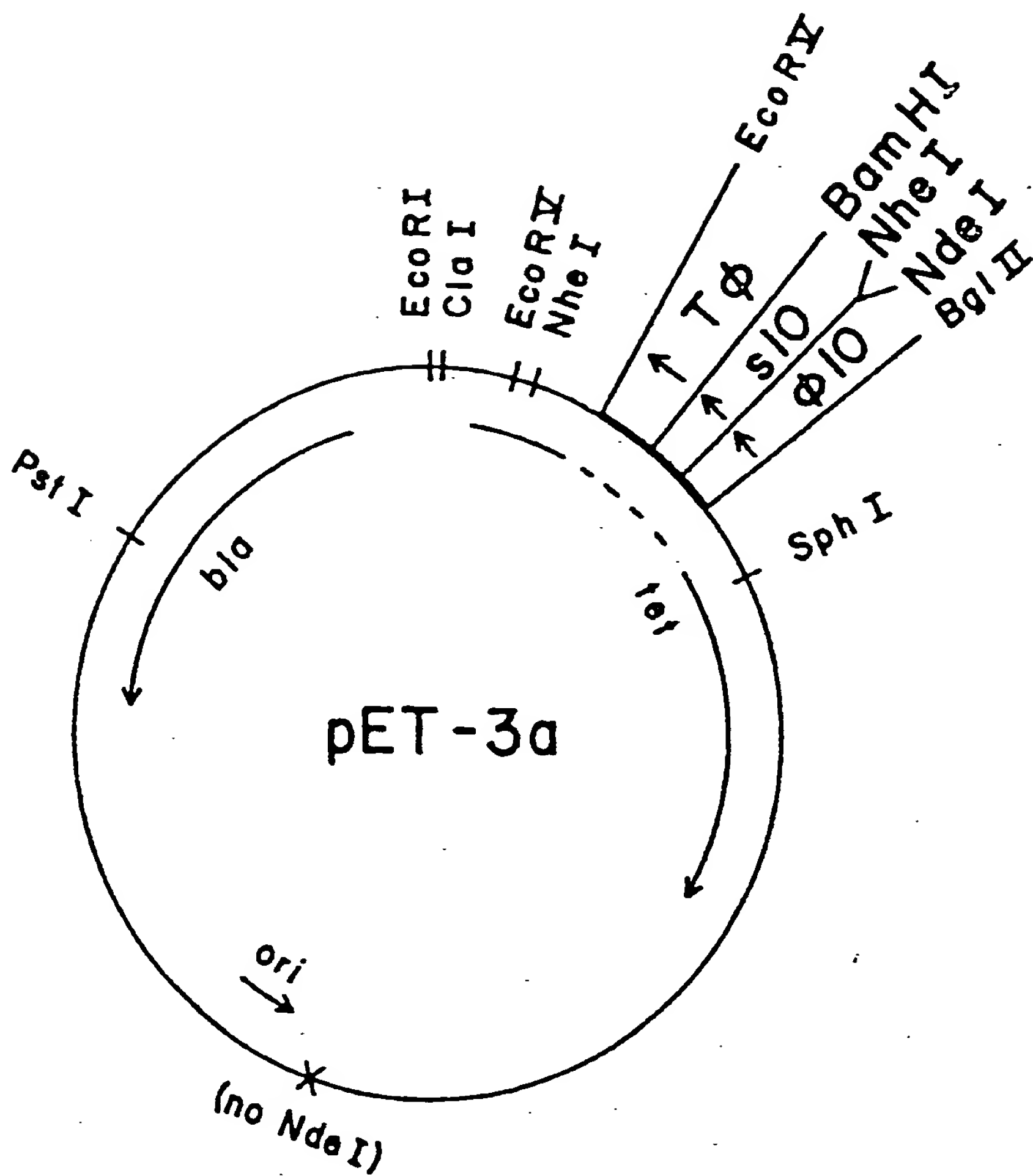
3 - ADNc hbFGF avec codon ATG 467 muté en GTG

4 - " " " GGA 440 " TGA (codon stop)

5 - " " " CTG 302 " TTG

6 - " " " CTG 302 " ATG

G / 14

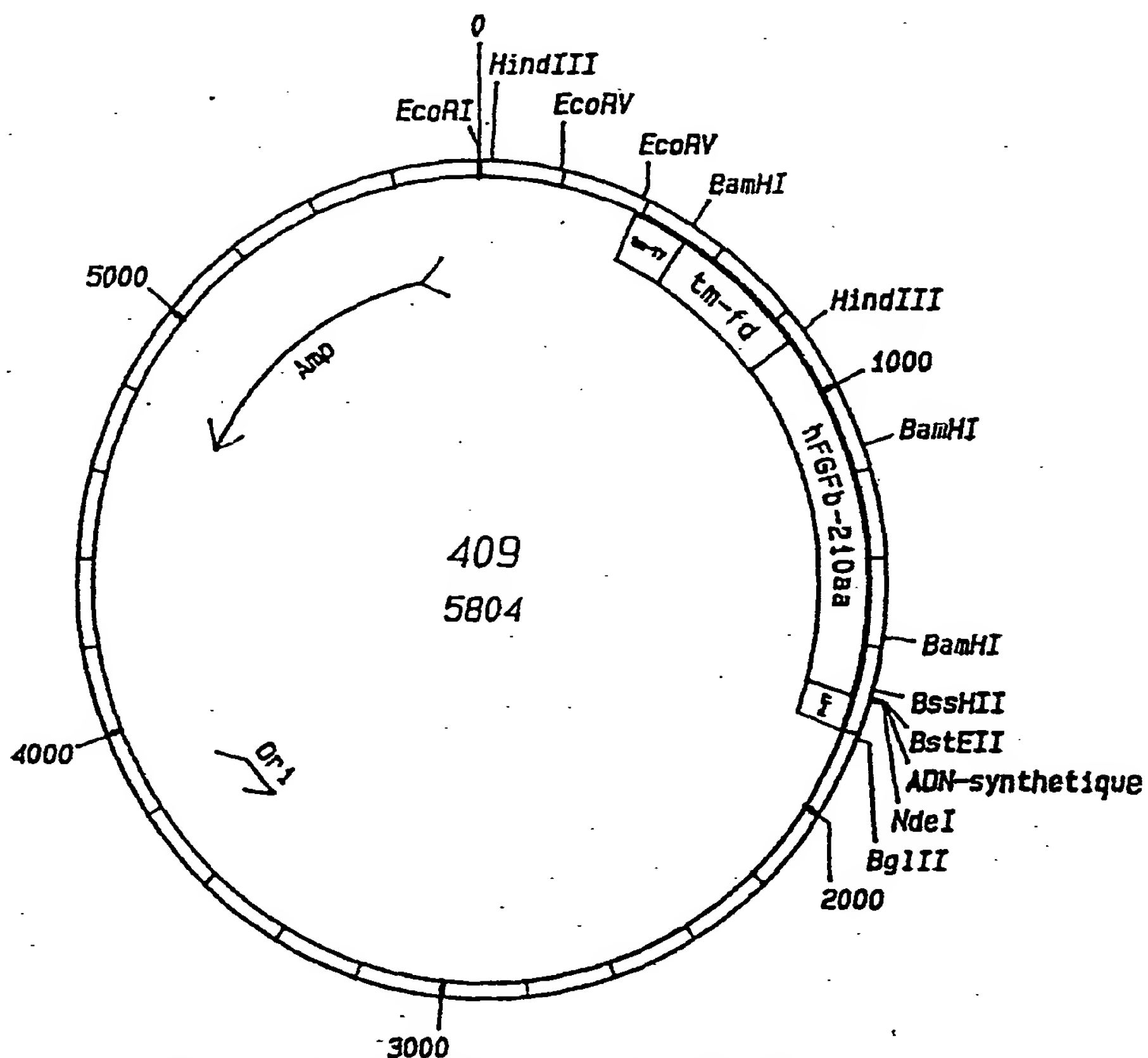
T ϕ - S

2642086

CARTE DU PLASMIDE D'EXPRESSION 409-2

7/14

T-19-7



Promoteur phi-10 du phage T7 : positions 1808-1721
 Sequence hbF6F-210aa : positions 1720- 857
 Terminateur du phage fd : positions 856- 516
 Terminateur phi-10 du phage T7: positions 515- 383

8 / 14

SEQUENCE CODANTE DU hbFGF DE 210 ACIDES AMINES

DU PLASMIDE 409-2



<p> A TGGGTGACCGTGGTTCGTGGTTCGCGCGCTG MetGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeu </p>	<p> CCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG ProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg </p>
<p> GGCCGTGCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCCGG GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArg </p>	<p> GGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC GlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg </p>
<p> GCGECTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCG AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgPro </p>	<p> GGCCCCGCAGGGACCATGGCAGCCGGGAGC GlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer </p>
<p> ATACCACGCTGCCCCGCTTGCCCGAGGGAT IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAsp </p>	<p> GGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCAC GlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis </p>
<p> TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGC AAA PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLys </p>	<p> AACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCC AsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro </p>
<p> GACGGCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGARG AspGlyArgValAspGlyValArgGluLys </p>	<p> AGCGACCCTCACATCAGCTACAAC TTCAA SerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln </p>
<p> GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAA AlaGluGluArgGlyValValSerIleLys </p>	<p> GGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG GlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet </p>
<p> AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAA LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLys </p>	<p> TGTGTTACGGATGAGTGT TTCTTTTGTAA CysValThrAspGluCysPhePhePheGlu </p>
<p> CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTAC ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyr </p>	<p> CGGTCAAGGAATACACCAGTTGGTATGTG ArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal </p>
<p> GCACTGAACGAACTGGGCAGTATAAACTT AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeu </p>	<p> GGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT GlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla </p>
<p> ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGC IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer </p>	<p> TGA End </p>

Les points indiquent les nucleotides modifiés par rapport à la
séquence sauvage

2642086

9 / 14

ACTIVITÉ MITOGÈNE DU hbFGF 22,5 kD

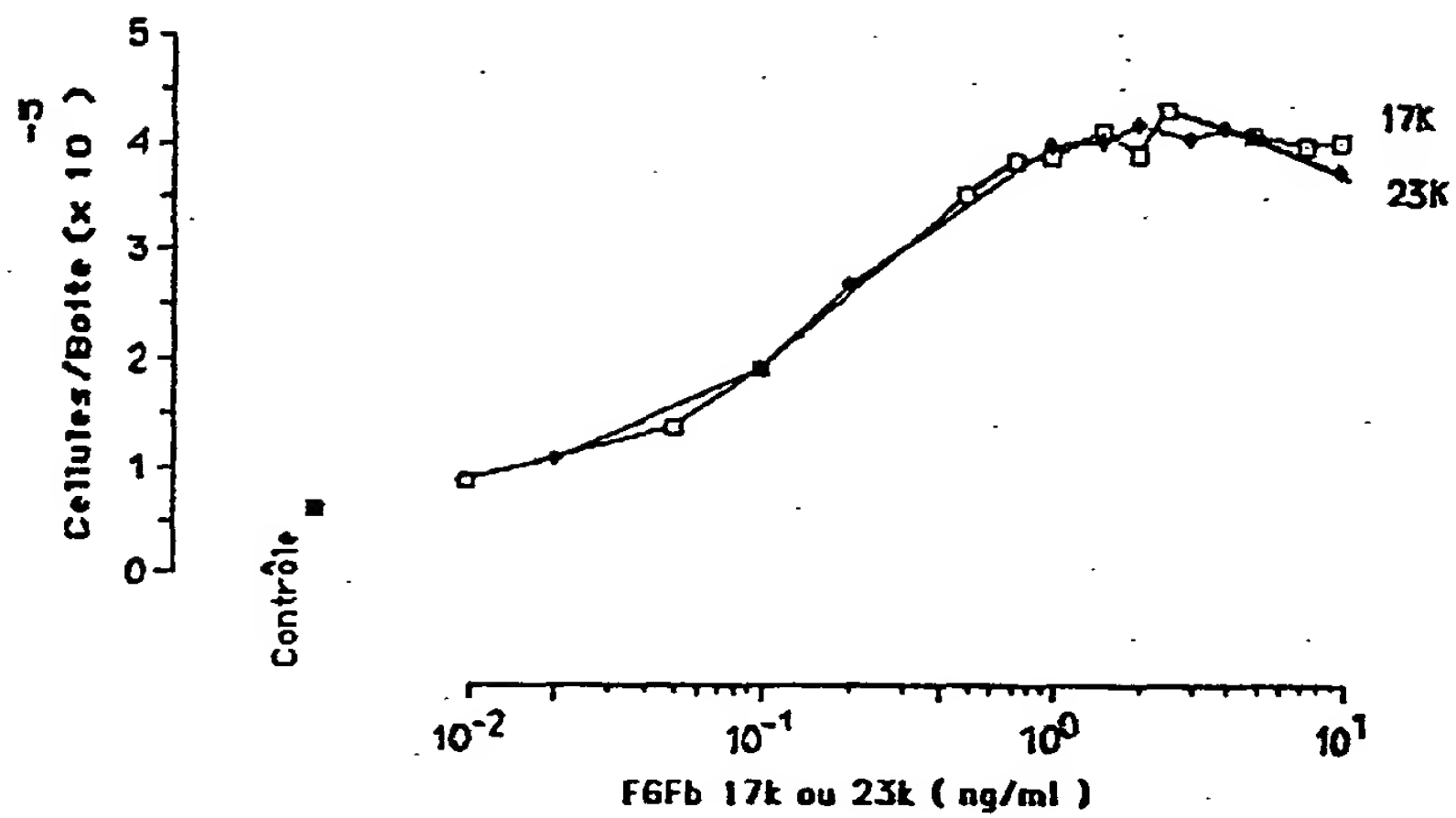


Fig 9

10 / 14

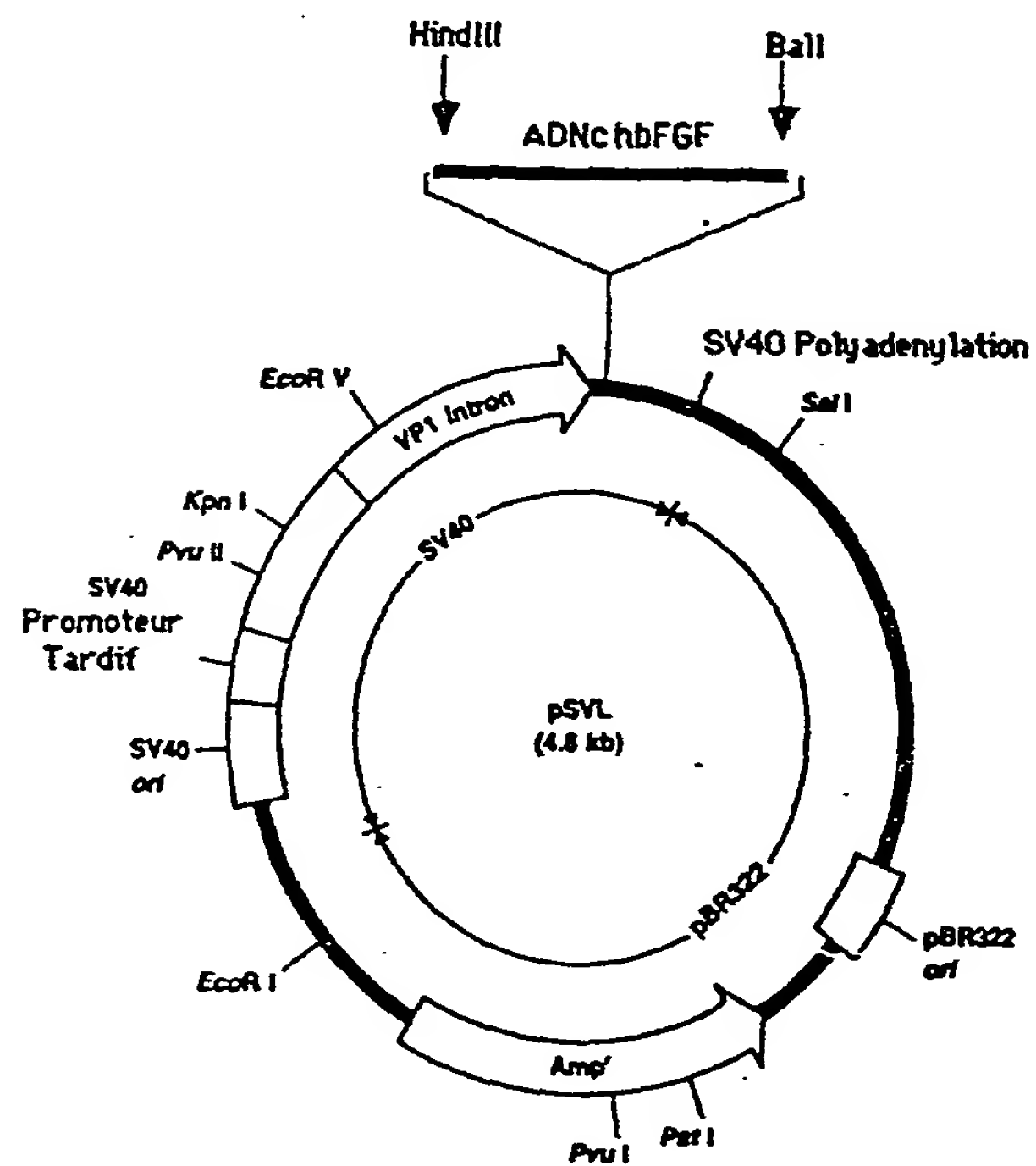
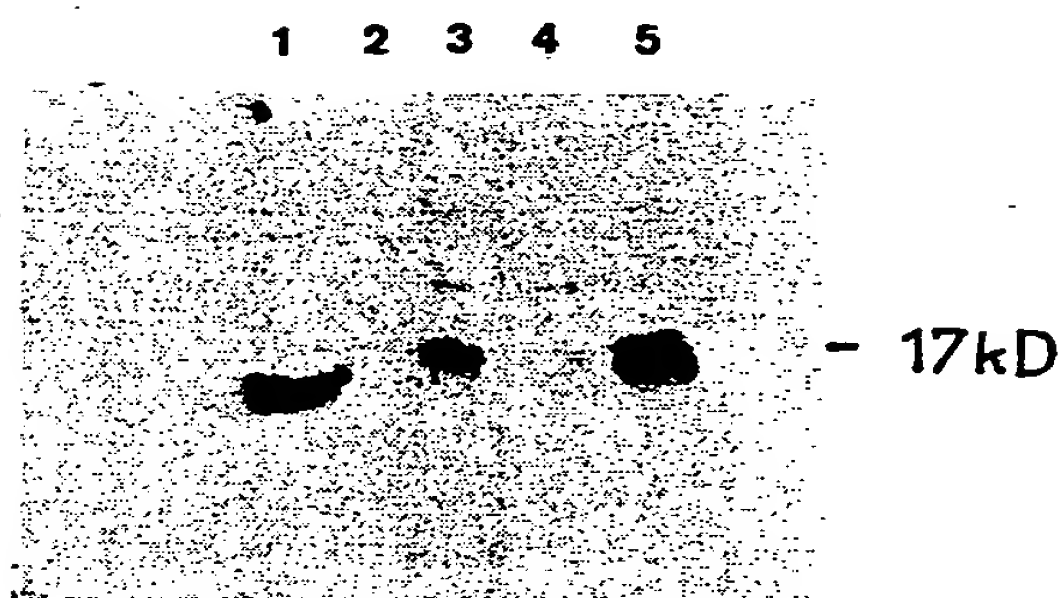
CARTE DU PLASMIDE D'EXPRESSION pSVL hbFGF ATG⁺

Fig. 10

11/14

ANALYSE DES EXTRAITS DE CELLULES COS-3
PAR IMMUNO-TRANSFERT

Fig. 11

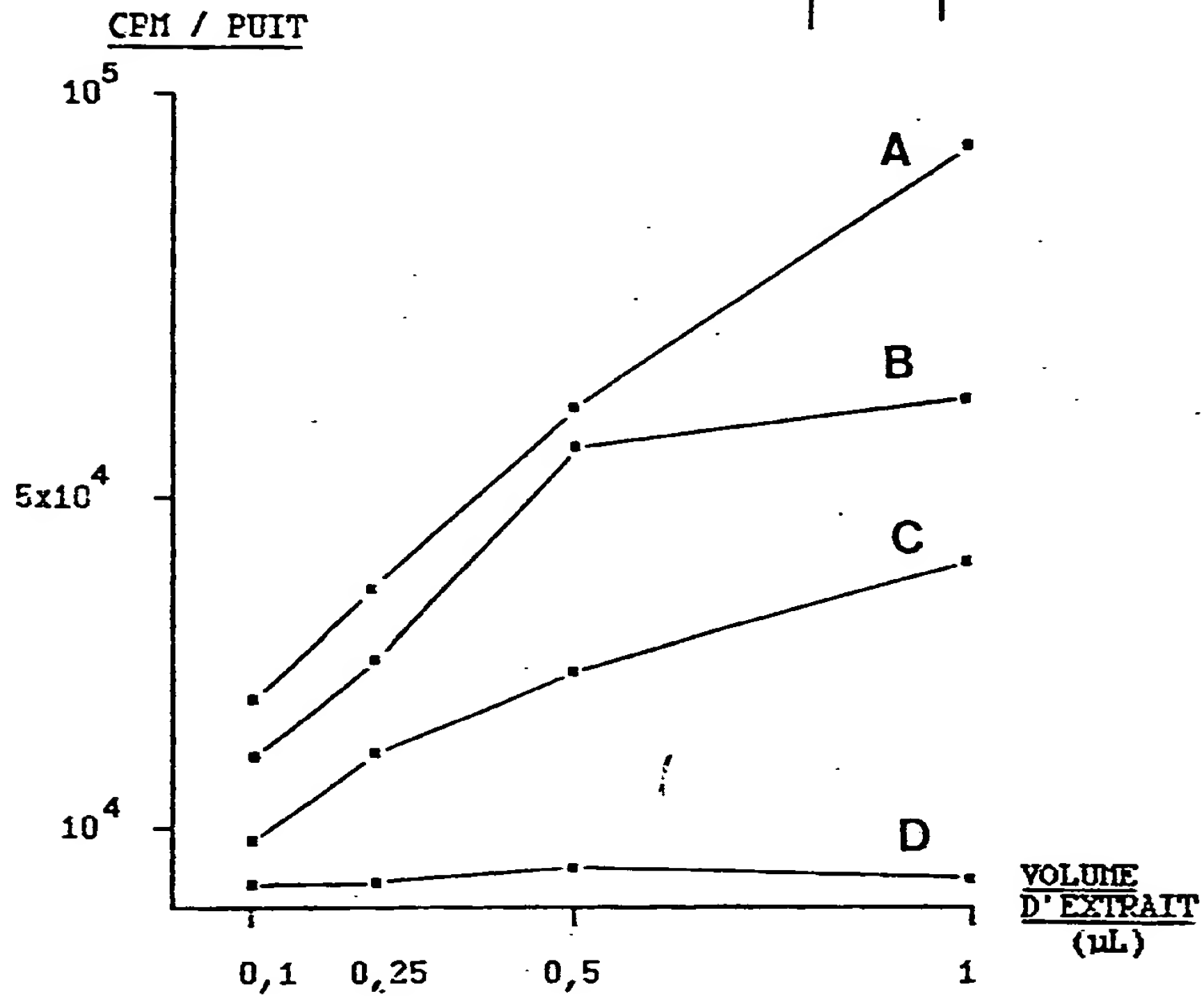


- 1 - bFGF recombinant de 17kD produit dans E.Coli
2 - Extrait cellules COS transfectées par pSVL
3 - " " " pSVL hbFGF ATG⁺
4 - " " " pSVL hbFGF ATG⁻
5 - " " " pSVL hbFGF Δ

12 / 14

CAPACITE DES EXTRAITS DE CELLULES COS A INDUIRE
LA SYNTHÈSE D'ADN DANS LES CELLULES BALB/C 3T3

Fig-12



- A - Extrait cellules COS transfectées par pSVL hbFGF Δ
 B - " " " " pSVL hbFGF ATG⁺
 C - " " " " pSVL hbFGF ATG⁻
 D - " " " " pSVL

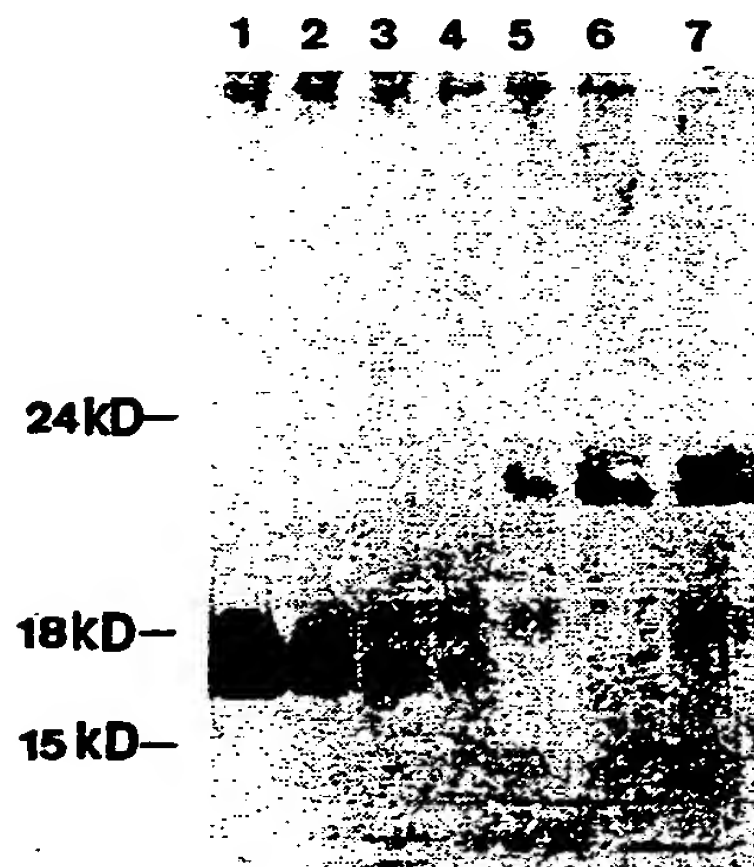
13 / 14

ANALYSE DU hbFGF 22,5kD PURIFIE PAR HEPARINE SEPHAROSE:

1, 2, 3 et 4 - 500ng, 100ng, 50ng et 15ng de bFGF 17kD (gamme témoin)

5, 6 et 7 - 1 μ l, 5 μ l et 10 μ l de hbFGF 22,5kD

Fig-13



2642086

14 / 14

PURIFICATION DU hbEGF 22.5KD PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

HPLC EN PHASE INVERSE

F15-14

